

BB

Full  
TextAN 1998-162531 [15] WPIDS

DNN N1998-129298 DNC C1998-052383

TI Determining skin irritation - comprises treating skin model with sample substance, removing sample substance and culturing skin model in large amount of culture liquid.

DC B04 D16 S03

PA (GNZE) GUNZE KK

CYC 1

PI JP--10028597 A 19980203 (199815)\* 9pJP---3129662 B2 20010131 (200109) 8p

ADT JP--10028597 A 1996JP-0206509 19960716; JP---3129662 B2 1996JP-0206509  
19960716

FDT JP---3129662 B2 Previous Publ. JP--10028597PRAI 1996JP-0206509 19960716AN 1998-162531 [15] WPIDS

AB JP 10028597 A UPAB: 19980410

Determining skin irritation comprises treating a skin model with a sample substance, removing the sample substance and culturing the skin model in a large amount of culture liquid.

ADVANTAGE - The method can substitute a skin irritation test using an animal. In an example, 0.5 g chloroform was added to 50 g of 3 mg/ml Type I collagen solution and homogenised at 6000 rpm for 1 minute and poured in a stainless steel frame and frozen at -40 deg. C and freeze-dried at 30 deg. C for 24 hours under 0.01 mmHg. It was further heated at 105 deg. C for 24 hours to effect dehydrative crosslinking. Then, it was immersed in 0.2 % glutaraldehyde solution for 24 hours to induce chemical crosslinking. It was again freeze-dried to give a highly crosslinked collagen sponge of a pore size of 90  $\mu$ m and 3 mm thickness. A low crosslinked collagen sponge of a pore size of 30  $\mu$ m and 1 mm thickness was also prepared. Human fibroblast was inoculated on the highly crosslinked collagen sponge and then cultured overnight and then the low crosslinked collagen sponge was placed on it and human keratinised cell was inoculated on it and cultured overnight to prepare a skin model.

Dwg. 0/6

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-28597

(43) 公開日 平成10年(1998) 2月3日

(51) Int. Cl. *	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C12Q 1/02		9452-4B	C12Q 1/02	
C12N 5/06			G01N 33/15	2
G01N 33/15			C12N 5/00	E

審査請求 未請求 請求項の数 2 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平8-206509

(22) 出願日 平成8年(1996) 7月16日

(71) 出願人 000001339

グンゼ株式会社

京都府綾部市青野町膳所 1 番地

(72) 発明者 諸田 勝保

京都府綾部市井倉新町石風呂 1 番地 グン  
ゼ株式会社京都研究所内

(72) 発明者 森田 真一郎

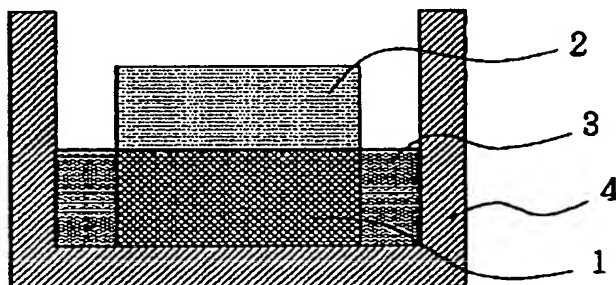
京都府綾部市井倉新町石風呂 1 番地 グン  
ゼ株式会社京都研究所内

(54) 【発明の名称】 皮膚刺激判定法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 本発明は、動物を用いた皮膚刺激性試験を代替し、かつ動物実験のデータと非常によく合致する皮膚刺激判定法を提供する。

【解決手段】 皮膚細胞を含む表皮・真皮の二層構造よりなる皮膚モデルを、界面活性剤等の被検物質で処理した後、かかる被検物質を除去し、更に該皮膚モデルを大量の培養液中で培養する皮膚刺激判定法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 皮膚モデルを被検物質で処理した後、かかる被検物質を除去し、更に該皮膚モデルを大量の培養液中で培養することを特徴とする皮膚刺激判定法。

【請求項2】 前記皮膚モデルが、皮膚細胞を含む表皮・真皮の二層構造よりなることを特徴とする請求項1に記載の皮膚刺激判定法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、皮膚モデルを用いた毒性試験に好適な皮膚刺激判定法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、動物愛護運動の高まりの中で、特に化粧品等の開発における動物実験の是非が問われており、化粧品開発における動物実験を全廃しようとする動きがある。このような状況の中、動物を用いた皮膚刺激性試験を代替する方法の一つとして、細胞を組み込んだ皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験が提案されている。即ち、化粧品や皮膚適用製剤等の皮膚刺激性試験を、皮膚モデルを用いて行う際、通常それらの成分の中で最もヒト皮膚に刺激を与えるのは界面活性剤であり、かかる界面活性剤の皮膚刺激性をいかに予測し得るかということとは重要なことであつた。

【0003】 しかしながら、これまでに報告されてきた方法では、皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験のデータと、動物実験のデータとが合致しない点がいくつかあった。例えば、強い皮膚刺激性のカチオン性界面活性剤が偽陰性を示す場合があったり、また逆にほとんど皮膚刺激性のないノニオン性界面活性剤が偽陽性を示す場合があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上述のような実状に鑑みてなされたもので、その目的とするところは、動物を用いた皮膚刺激性試験を代替し、かつ動物実験のデータと非常によく合致する、皮膚モデルを用いた皮膚刺激判定法を提供する点にある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 即ち、本発明は、皮膚モデルを被検物質で処理した後、かかる被検物質を除去し、更に該皮膚モデルを大量の培養液中で培養することに特徴を有する。更に、皮膚モデルが、皮膚細胞を含む表皮・真皮の二層構造よりなることに特徴を有する。

【0006】 前記構成とすることにより、動物実験のデータと非常によく合致する、皮膚モデルを用いた皮膚刺激判定法が得られた。従来の方法がなぜ動物実験のデータと合致しなかったのか、その詳細な理由は分からないが、おそらく次のようなことに起因しているものと思われる。

【0007】 即ち、皮膚モデルを用いた毒性試験ではほとんどの場合、「細胞死」を指標としており、ある種の

カチオン性界面活性剤（例えばCetylpyridinium Chloride: CPC）の場合、細胞に傷害を与えてからそれが細胞死（あるいはそれに準ずる反応）として現れるまでにタイムラグがあり、それがしばしば偽陰性を示す主原因であつたと思われる。

【0008】 一方、ある種のノニオン性界面活性剤（例えばPolyoxyethylene Octylphenylether: TX100）の場合、細胞毒性は強いものの角質層透過性が低く、更には拡散希釈効果によって動物実験での皮膚刺激性は低いが、皮膚モデルでは拡散希釈効果が低いため、長時間作用させるうちに蓄積が進み毒性を示すようになり、これがしばしば偽陽性を示す主原因であつたと思われる。

【0009】 従って、従来の方法では、CPCのようなカチオン性界面活性剤に合わせて条件を設定すると、TX100のようなノニオン性界面活性剤が偽陽性を、逆にTX100のようなノニオン性界面活性剤に合わせて条件を設定すると、CPCのようなカチオン性界面活性剤が偽陰性を示すことになり、常にいずれか一方がin vivo データと合致しなかったのである。

【0010】 本発明の、皮膚モデルを用いた皮膚刺激判定法は、この二律背反する両者を同時に改善したものであり、皮膚モデルを被検物質で一定時間処理した後、かかる被検物質を除去することにより、必要以上の処理を防ぎ、ある種のノニオン性界面活性剤（例えばPolyoxyethylene Octylphenylether: TX100）のような物質が偽陽性を示すのを防ぐことができる。また、皮膚モデルを大量の培養液中で一定時間培養することにより、ある種のカチオン性界面活性剤（例えばCetylpyridinium Chloride: CPC）のような物質による傷害が細胞死として現れてくるので、偽陰性を示すのを防ぐことができる。更に、大量の培養液中で培養するので、ある程度の希釈拡散効果を持たせることができる。

【0011】 前記構成において、本発明に適用できる皮膚モデルとは、皮膚細胞を含む表皮・真皮の二層構造よりなるものであればよく、例えば本出願人が既に開示している特開平8-89239号（特願平6-263047号）に記載されている培養皮膚が好適に用いられる。また、被検物質としては、界面活性剤の他に、化粧品、洗浄剤、あるいは皮膚適用製剤等が挙げられ、更に界面活性剤としては、カチオン性界面活性剤（Benzethonium Chloride: BTC、Cetylpyridinium Chloride: CPC、Stearyl Trimethyl Ammonium Chloride: STAC等）、アニオン性界面活性剤（Sodium Lauryl sulfate: SLS、Potassium Laurate: PL等）、あるいはノニオン性界面活性剤（Polyoxyethylene 23 Lauryl Ether: B35、Sucrose Fatty Acid Ester: SFAE、1-Octylphenoxy polyethoxyethanol: TX100、Polyoxyethylene sorbitan monolaurate: TW20、Polyoxyethylene sorbitan monooleate: TW80等）が挙げられる。

【0012】皮膚モデルを被検物質で処理する時間は、長すぎても短すぎても好ましくなく、該処理時間は被検物質の種類により異なるが、例えば被検物質が界面活性剤の場合、好ましくは1分間～1時間処理するのが好ましい。被検物質で処理された皮膚モデルは、被検物質を除去後、大量の培養液中で一定時間培養されるが、かかる培養液としては、MEM、DMEM等、一般的な培養液に、1～10%程度のウシ胎児血清を添加したものが好ましい。また、培養時間は培養液の種類により異なるが、好ましくは3～24時間培養するのが好ましい。

【0013】

【発明の実施の形態】

【実施例】

(実施例1)

# 1. 皮膚モデル(培養皮膚)の作製

## (1) 高架橋スポンジの作製

3mg/mlに希釈したType Iコラーゲン溶液50gにクロロホルム0.5gを添加し、ホモジナイザーを用いて6000rpmで1分間ホモジナイズしたものをステンレス製枠に流し込み、-40℃で凍結し、これを真空減圧下(0.01mmHg)、30℃で24時間凍結乾燥した。更に、真空減圧下(0.01mmHg)、105℃で24時間熱脱水架橋を加えた後、0.2%グルタルアルデヒド溶液に24時間浸漬することにより化学架橋を導入した。これを再び凍結乾燥して孔径90μm、厚さ3mmの高架橋コラーゲンスポンジを得た。

## 【0014】(2) 低架橋スポンジの作製

0.3%水溶液(pH3)のType Iコラーゲンをエタノールで希釈し、0.285%コラーゲン、10%エタノール水溶液とした。更に、この溶液を直径9cmのシャーレに10g流し込み、-135℃で凍結し、真空度:0.1、乾燥温度:40℃、乾燥時間:24時間の条件で凍結乾燥を行い、更に真空減圧下(0.01mmHg)、105℃で24時間熱脱水架橋して、孔径30μm、厚さ1mmの低架橋コラーゲンスポンジを得た。

## 【0015】(3) 細胞の播種及び培養

24ウェル培養プレートの底面に、(1)で作製した高架橋コラーゲンスポンジを敷き詰め、クラボウ(株)から購入したヒト繊維芽細胞をMEM+10%血清培地に懸濁し、このスポンジ上に $5.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の濃度で播種し、細胞が完全に接着するまで37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。次に、このスポンジ上に(2)で作製した低架橋コラーゲンスポンジを重ね、クラボウ(株)から購入したヒト角化細胞をKGM培地に懸濁し、この低架橋コラーゲンスポンジ上に $5.0 \times 10^4$

cells/cm<sup>2</sup>の濃度で播種し、細胞が完全に接着するまで37℃、5%CO<sub>2</sub>で一晩培養した。次に、かかる培養基材を24ウェル培養プレートから取り出し、6ウェル培養プレートに移した後、培地をDME+5%血清培地に変更した。ヒト角化細胞が空気中に出るように培養液の量を調整しながら5日間培養を続けた後、所望の皮膚モデル(培養皮膚)を得た。なお、上記した高架橋コラーゲンスポンジ、低架橋コラーゲンスポンジとは、それぞれ高度に架橋したコラーゲンスポンジ、低度に架橋したコラーゲンスポンジのことであり、表皮層には低架橋コラーゲンスポンジを用い、真皮層には高架橋コラーゲンスポンジを用いた。

## 【0016】2. 皮膚刺激判定

上記1によって作製された直径8mmの円形で筒状の皮膚モデルを以下の判定法に用いた。

### (1) 準備段階

図1及び図2は、それぞれ培地の入った培養プレートに皮膚モデルを置いた時の状態を示した断面図及びその平面図であり、本発明の判定法の準備として、24ウェルプレート4に、DME+5%血清培地3を250μl分注し、この中に皮膚モデルを置いた。この際、表皮層2を気液界面上に、かつ真皮層1をDME+5%血清培地3中にあるようにした。

### (2) 被検物質処理

表皮層にのみ作用するように、表皮層上に被検物質100μlを滴下し、一定時間作用させた。

### (3) 洗浄

表皮層に残った被検物質を、PBSバッファで洗い落とした。

### (4) インキュベーション

24ウェルプレートにDME+5%血清培地1.5mlを分注し、この中に皮膚モデル(培養皮膚)を沈め、一晩培養した。

### (5) MTT法により生細胞数を測定した。

(6) 上記の方法で被検物質作用時間を10分間に設定し、被検物質として10種類の界面活性剤10%溶液(溶媒:PBS)についてそれぞれ試験を行った。その結果を表1に示す。

なお、試験結果はMTT発色後570nmの吸光度を測定し、PBSのみを作用させた場合の吸光度を100%として次式より比を求め、それを細胞生存率(%)とした。

【0017】

【数1】

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \frac{\Delta A_{570} (\text{被検物質-ブランク}^*)}{\Delta A_{570} (\text{コントロール-ブランク}^*)} \times 100$$

※ブランク：細胞の全く入っていないスポンジに  
MTT溶液を作用させた後の吸光度

【0018】一方in vivo 動物実験としては、日本白色種ウサギの健常皮膚を用い、10%濃度に調整した各被検物質を4時間閉塞貼付し、除去後1時間、24時間および48時間後にドレイズ基準により判定した。得られたin vivo 動物実験データを表1及び表2に示す。また、本発明の判定法により得られたデータと、in vivo 動物実験データとの比較図を図3に示す。図3から明らかなように、両者は非常によい相関を示していることが判る。

【0019】(比較例1)実施例1の1で作製した皮膚モデル(培養皮膚)を用い、被検物質として実施例1で用いたものと同じ10種類の界面活性剤について従来法で試験を行った。方法としては、被検物質を1時間および24時間作用後インキュベーションを行わずそのままMTT法で生細胞数を測定した。得られたデータを、実施例1と同様in vivo 動物実験データと比較した。その結果を表2に示す。また、従来法により得られたデータと、in vivo 動物実験データとの比較図を図4の(a)、(b)に示す。これらの図より、1時間処理ではカチオン系のCPCおよびSTACが偽陰性を、24時間処理ではノニオン系のB35およびTX100が偽陽性を示すことが判る。

【0020】(実施例2)被検物質が、化粧品(シャンプー、ウォッシング)であるという以外は、実施例1と同様の条件で行った。in vivo 動物実験のデータと比較した結果を表3に示す。また、本発明の判定法により得られたデータと、in vivo 動物実験データとの比較図を図5に示す。図5から明らかなように、両者は非常によい相関を示していることが判る。

【0021】(比較例2)被検物質が、化粧品(シャン

プー、ウォッシング)であるという以外は、比較例1と同様の条件で行った。in vivo 動物実験のデータと比較した結果を表3に示す。また、従来法により得られたデータと、in vivo 動物実験データとの比較図を図6の(a)、(b)に示す。これらの図から明らかなように、両者は1時間処理及び24時間処理ともほとんど合致していないことが判る。

【0022】

【発明の効果】以上説明したように本発明によれば、動物を用いた皮膚刺激性試験を代替し、かつ動物実験のデータと非常によく合致する皮膚刺激判定法を提供できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】培地の入った培養プレートに皮膚モデルを置いた時の状態を示した断面図である。

【図2】図1の平面図である。

【図3】実施例1における相関関係を示した図である。

【図4】(a)比較例1の1時間処理における図である。

(b)比較例1の24時間処理における図である。

【図5】実施例2における相関関係を示した図である。

【図6】(a)比較例2の1時間処理における図である。

(b)比較例2の24時間処理における図である。

【符号の説明】

1. 真皮層
2. 表皮層
3. DME+5%血清培地
4. 24ウェルプレート

【表1】

被 検 物 質		in vivo刺激点	細胞生存率(%)
カチオン性 界面活性剤	Benzethonium Chloride : B T C	4 . 0	3 . 5
	Cetylpyridinium Chloride : C P C	5 . 0	5 . 6
	Stearyl Trimethyl Ammoni um Chloride : S T A C	4 . 7	2 5 . 0
アニオン性 界面活性剤	Sodium Lauryl sulfate : S L S	6 . 0	0 . 0
	Potassium Laurate : P L	5 . 3	3 2 . 4
ノニオン性 界面活性剤	Polyoxyethylene 23 Laury l Ether : B 3 5	0 . 3	9 8 . 2
	Sucrose Fatty Acid Ester : S F A E	0 . 3	1 0 2 . 3
	t-Octylphenoxypolyethoxy ethanol : T X 1 0 0	0 . 0	1 0 4 . 1
	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate : T W 2 0	0 . 0	1 0 9 . 8
	Polyoxyethylene sorbitan monooleate : T W 8 0	0 . 3	8 8 . 1

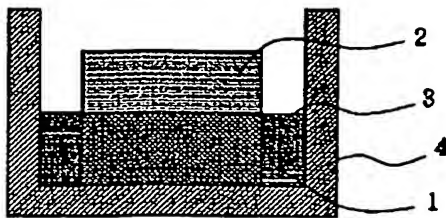
【表 2】

被 検 物 質		in vivo 刺激点	細胞生存率 (%)	
			1 時間 処 理	24 時間 処 理
カチオン性 界面活性剤	Benzethonium Chloride : BTC	4. 0	33.6	10.5
	Cetylpyridinium Chloride : CPC	5. 0	111.3	10.9
	Stearyl Trimethyl Ammoni um Chloride : STAC	4. 7	111.0	16.3
アニオン性 界面活性剤	Sodium Lauryl sulfate : SLS	6. 0	36.2	5.2
	Potassium Laurate : PL	5. 3	10.2	10.5
ノニオン性 界面活性剤	Polyoxyethylene 23 Laury l Ether : B35	0. 3	121.2	10.5
	Sucrose Fatty Acid Ester : SFAE	0. 3	110.5	136.4
	t-Octylphenoxy polyethoxy ethanol : TX100	0. 0	128.2	6.3
	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate : TW20	0. 0	104.1	131.3
	Polyoxyethylene sorbitan monooleate : TW80	0. 3	115.3	142.1

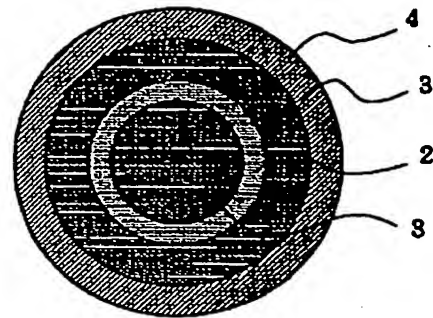
【表 3】

被 検 物 質		in vivo 刺激点	(実施例 2) 細胞生存率 (%)	(比較例 2) 細胞生存率 (%)	
				1 時間 処 理	24 時間 処 理
シャンプー	PTS	6. 0	5. 3	32.5	3.6
	STS	1. 0	90. 3	30.3	7.7
ウォッシング	HA	0. 3	90. 6	48.7	9.6
	BC	1. 7	75. 1	73.0	7.5
	MW	0. 0	116. 9	105.3	10.9

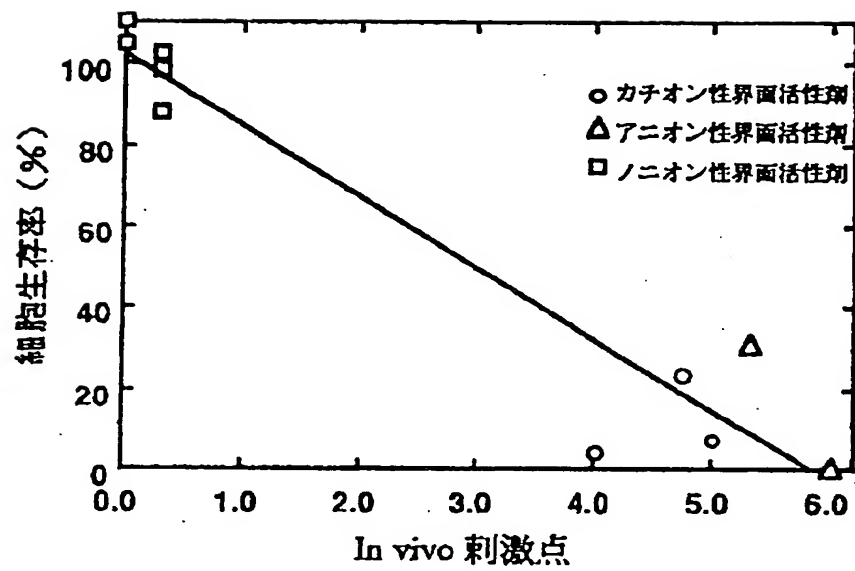
【図1】



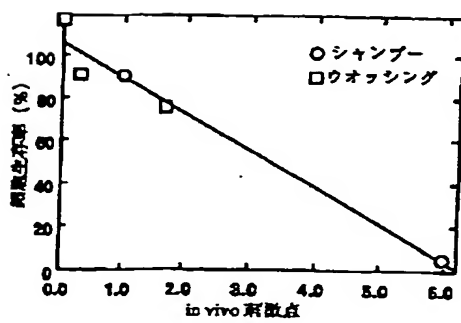
【図2】



【図3】

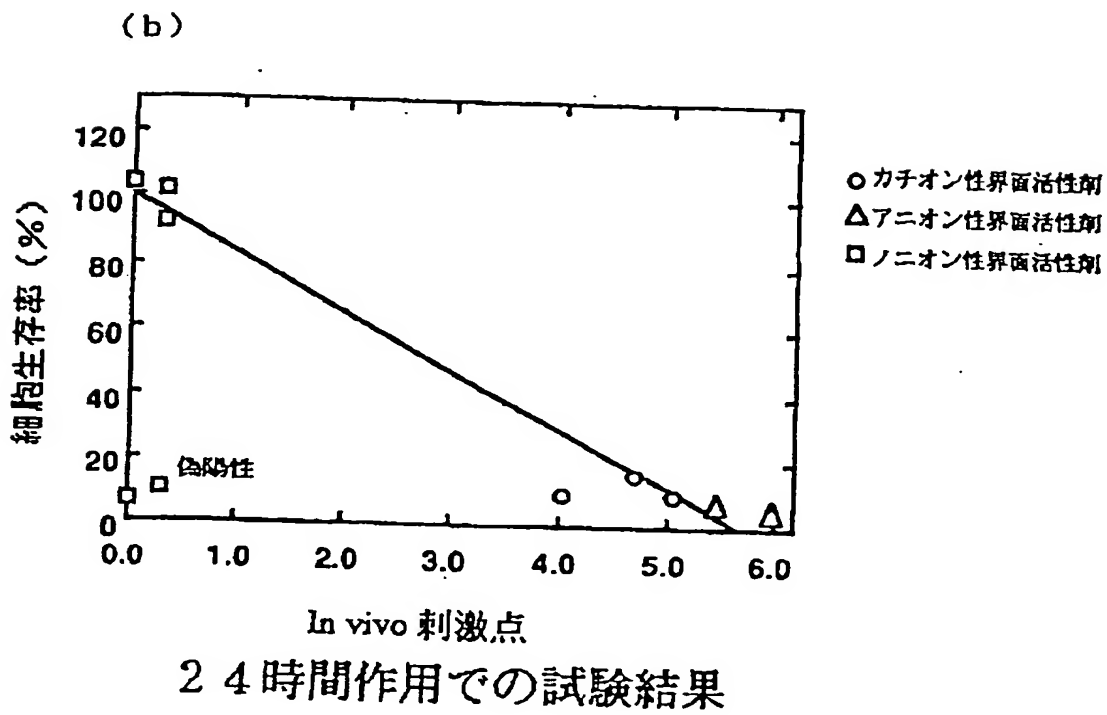
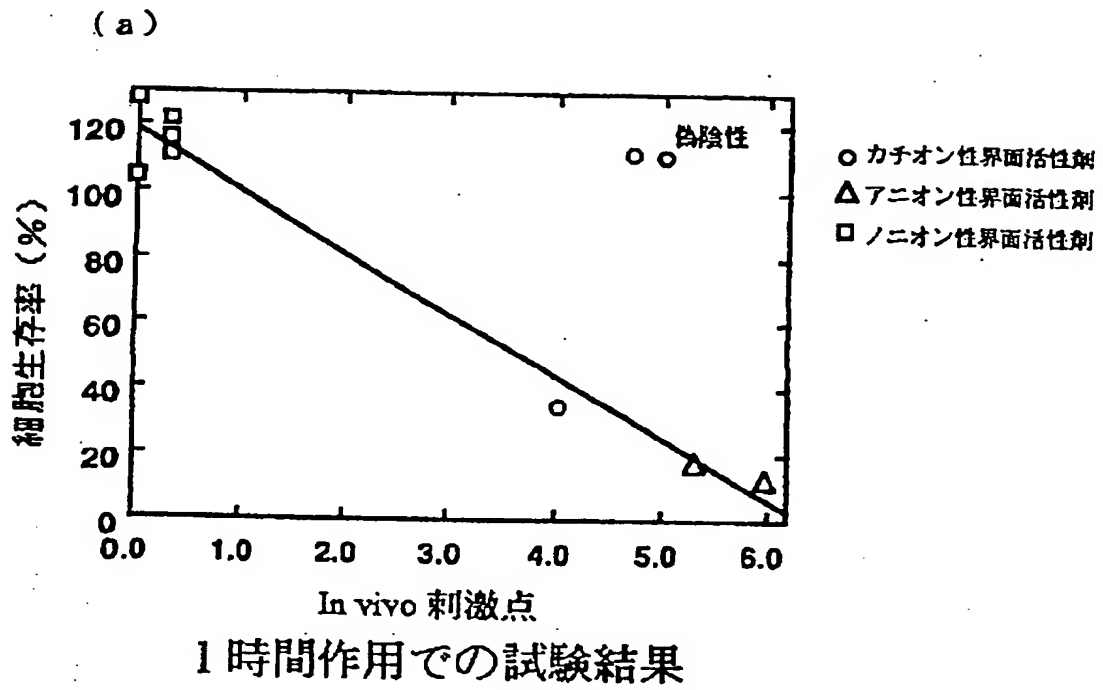


【図5】





【図4】



【図6】

